

УДК 538.911,532.51,57.032

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОТЕКАНИЯ ЖИДКОСТИ СКВОЗЬ ПУСТОТНОЕ ПРОСТРАНСТВО МАТРИКСА

© 2019 г. А. А. Михуткин¹, Т. Х. Тенчурин¹, Т. Е. Григорьев¹,
С. Н. Чвалун¹, А. Л. Васильев^{1,2,*}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение Национальный исследовательский центр
“Курчатовский институт”, Москва, Россия

²Федеральное государственное учреждение “Федеральный научно-исследовательский центр
”Кристаллография и фотоника” Российской академии наук”, Москва, Россия

*E-mail: a.vasiliev56@gmail.com

Поступила в редакцию 29.04.2019 г.

После доработки 10.06.2019 г.

Принята к публикации 27.07.2019 г.

Рассмотрены подходы и результаты моделирования протекания культуральной жидкости сквозь нетканый полимерный матрикс на основе полиамида-6, имитирующего процессы в биореакторе с целью создания оптимальных условий роста клеток. Используя анализ экспериментальных данных трехмерной модели матрикса, оценены параметры полей скоростей, давлений и проницаемости.

DOI: 10.1134/S0367676519110176

ВВЕДЕНИЕ

Матрикс природного или синтетического происхождения активно используются в медицине как для непосредственной имплантации для выполнения каркасной функции в образовании новой ткани в организме, так и для создания искусственных клеточных конструкций в биореакторах. Материалам, методам формирования и микроструктуре матриксов посвящено множество работ, часть из которых представлена в обзорах [1–5]. В этих обзорах и ряде статей рассматриваются различные методы восстановления трехмерной структуры матриксов: конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ) [4], растровая электронная микроскопия [4, 6, 7], просвечивающая электронная микроскопия [8], рентгеновская томография [9, 10], атомно-силовая микроскопия [4], сканирующая зондовая нанотомография [11]. С помощью этих методов были определены морфологические особенности различных матриксов и получены данные о размерах волокон и пор, оценено пористое пространство. Применение матриксов в биореакторах диктует новые требования к их микроструктуре и морфологии для обеспечения эффективного протока культуральной жидкости. Также в ряде работ показано, что перфузионное засеивание клеточных культур на матрикс позволяет достичь более высоких степеней интеграции по всей трехмерной структуре [12]. Кроме того, скорость потока элюэнта оказывает значительное влияние на

выживаемость клеток в биореакторе [13]. Однако в известных литературных источниках отсутствуют данные о процессе протекания жидкостей через матриксы, хотя определение полей скоростей и давлений может оказать значительную помощь при выборе параметров работы биореактора. Настоящая работа, в которой представлены методы и результаты моделирования протекания культуральной среды (жидкости) через нетканый матрикс, изготовленный из полиамида-6 (ПА-6), отчасти ликвидирует этот пробел.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Формирование матриксов из ПА-6 подробно описана в статье [14], поэтому в настоящей работе на этом мы не будем подробно останавливаться. Восстановление трехмерной структуры матриксов, необходимой для расчетов протекания жидкостей, было проделано на основе данных конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ). Регистрацию трехмерных стеков изображений осуществляли с помощью КЛСМ Olympus FV10i-W (Olympus Corporation, Japan) с использованием 60-кратного водоиммерсионного объектива UPLSAP60xW с числовой апертурой NA 1.2. Стек представлял собой трехмерный массив данных из серии изображений, отстоящих друг от друга на определенный шаг по глубине. В качестве источника использовали лазер с длиной волны 405 нм, регистрацию сигнала проводили в

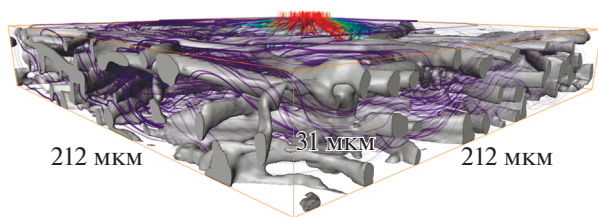


Рис. 1. Визуализация векторного поля скоростей с поверхностной моделью волокон: волокна показаны серым цветом, линии потока — цветные линии, цвет отражает значение скорости (первый подход).

диапазоне 420–520 нм. Размер изображений ($X \times Y$) составлял: 1024×1024 пикселя (латеральный размер изображений 212×212 мкм), шаг по глубине (по оси Z) — 0.5 мкм. Образец полностью погружался в иммерсионную жидкость, в качестве которой была выбрана культуральная среда RPMI-1648, которая используется в биореакторе для пролиферации клеток. Обработка, реконструкция, визуализация и анализ трехмерного массива данных проводились с применением программного обеспечения Avizo v9.0.1 (FEI, США).

Вначале осуществляли обработку и фильтрацию экспериментальных трехмерных стеков, затем изображения сегментировали. На основе массива бинарных данных, полученных в результате процесса сегментирования, генерировали поверхностную модель исследуемых объектов, т.е. полимерных волокон и пустотного пространства. Более подробно методы трехмерной реконструкции и анализа матриц описаны в работе [14]. Для моделирования протекания жидкости использовали расширение Avizo XLab Hydro Extension. Применяли два подхода: первый — экспериментальное моделирование, основанное на решении уравнений Стокса, где анализируемый объем материала герметично ограничивается плоскостями твердой фазы по четырем граням объема, параллельным направлению основного потока. Это направляет поток сквозь образец, не позволяя жидкости выйти из системы, при этом она равномерно распределяется по входной поверхности. Таким образом, в качестве граничных условий добавляется одновоксельная плоскость твердой фазы на гранях объема, параллельных направлению основного потока с условием отсутствия скольжения на границах жидкость–твердое тело. Задается постоянная разница входного и выходного давлений жидкости на открытых гранях, составившая 0.1 атм в проведенном моделировании. При этом рассматривается только однофазная несжимаемая ньютоновская жидкость и стационарный ламинарный поток. Значение динамической вязкости жидкости было выбрано $0.001 \text{ Па} \cdot \text{с}$. Абсолютная проницаемость материала, которая связывается со свойством пористого мате-

риала пропускать однофазную жидкость, численно оценена с применением закона Дарси [15].

Второй подход позволяет увеличить размеры моделируемого объекта по объему до бесконечности за счет задания периодических граничных условий. Подробно этот метод рассмотрен в работе [16]. При этом рассматривали эффективную проницаемость, которая представляется в тензорном виде и характеризует проницаемость в зависимости от направления потока в пространстве.

Для моделирования протекания жидкости использованы данные восстановления трехмерной структуры матрикса и пустотного пространства, представленные в работе [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате моделирования с использованием первого подхода были вычислены векторное поле скоростей и скалярное поле давлений жидкости, входящие в систему уравнений Стокса, и определена абсолютная проницаемость исследуемого материала, которая составила 0.14 мкм^2 . Такое значение свидетельствует об относительно высокой проницаемости образца.

Трехмерное векторное поле скоростей (рис. 1) было визуализировано методом освещенных линий потока (ОЛП) [17], а структура направленности векторного поля скоростей (рис. 2а) — на плоскости поперечного сечения с помощью вариации метода визуализации ОЛП [18]. Скалярное поле давлений на поперечном сечении представлено на рис. 2б. На всех представленных изображениях направление потока показано сверху вниз.

В результате моделирования протекания жидкости с применением второго подхода были вычислены тензор скоростей (три векторных поля возмущения скорости для направления потока по трем осям — X , Y , Z) и вектор возмущения давления. Кроме этого вычислена эффективная проницаемость (тензор проницаемости).

На рис. 3 представлена визуализация векторного поля возмущения скорости (по оси Z), а на рис. 4 — скалярного поля возмущения давления (аналогично) при моделировании вторым подходом.

Рис. 1 и 2а представляют собой стоп-кадры динамической картины прохождения потока культуральной жидкости через матрикс. Такие картины помогают понять динамику поступления культуральной жидкости в разные области матрикса: существуют ли “мертвые” зоны, т.е. зоны, куда не поступает культуральная жидкость или происходит застой жидкости, каково давление жидкости, возникает ли значительная разница в давлениях в разных частях матрикса. Так, на основании рис. 1 и 2а можно предположить, произойдет ли полноценная адгезия клеток на мат-

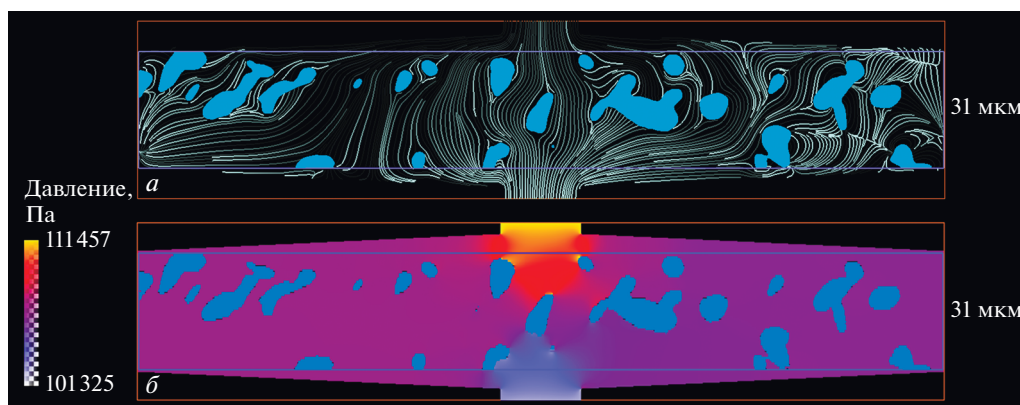


Рис. 2. Визуализация векторного поля скоростей (*a*) и скалярного поля давлений (*б*) на поперечном сечении: волокна показаны синим цветом, границы анализируемого объема обозначены внутренней рамкой (синей), цвет отражает значение давления (первый подход).

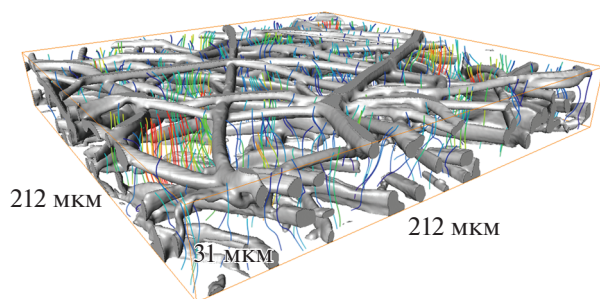


Рис. 3. Визуализация векторного поля возмущения скорости с поверхностной моделью волокон: волокна показаны серым цветом, линии потока – цветные линии, где цвет отражает значение скорости (второй подход).

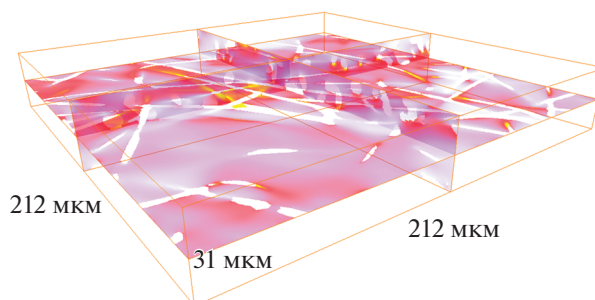


Рис. 4. Визуализация скалярного поля возмущения давления (поперечные сечения; второй подход).

рикс и смогут ли они задержаться, т.е. не “смот” ли их поток. Похожий результат получается и при обработке результатов, получаемых с использованием второго подхода, представленных на рис. 3, 2б и 4. Эти рисунки показывают, что разница в давлении в разных частях образца незначительна, конструкция матрикса обеспечивает равномерное поступление культуральной жидкости во все рассматриваемые области матрикса. Небольшие различия в распределении давления по правой и левой сторонам образца и спад давления по центру перед выходом из системы могут свидетельствовать о вероятности возникновения флуктуаций, которые могут негативно повлиять на процессы адгезии и пролиферации клеток.

Необходимо отметить, что поля скоростей и давлений во втором подходе моделирования дают более реалистичные представления о характере распределения, как если бы анализируемый объект был частью макроскопического образца. Это приводит к разнице в направленности потока (рис. 3). В этой модели поток более равномерно

проходит сквозь толщу матрикса и может быть представлен почти параллельными линиями. Как оказалось, скорость потока характеризуется преимущественной латеральной зависимостью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, были разработаны два способа расчетов параметров протекания жидкости через матрикс, состоящий из волокон. Определены с трехмерной визуализацией следующие параметры протекания жидкости: векторное поле скоростей, скалярное поле давлений, векторное поле возмущения скорости и скалярное поле возмущения давления. Также определена абсолютная проницаемость исследуемого материала. Полученные данные могут быть использованы для разработки микроструктурных параметров матрикса и характеристик потоков культуральной среды в биореакторах.

Работа выполнена при поддержке грантом РНФ № 17-13-01376 “Визуализация процессов ад-

гезии и пролиферации стромальных и эпителиальных клеток на матриксах различного типа на основе биосовместимых полимеров”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Yang S., Leong K.-F., Du Z., Chua C.-K.* // *Tissue Engin.* 2001. V. 7. № 6. P. 679.
2. *Yang S., Leong K.-F., Du Z., Chua C.-K.* // *Tissue Engin.* 2002. V. 8. № 6. P. 1.
3. *Волкова И.М., Коровина Д.Г.* // *Биотехнология.* 2015. Т. 2. С. 8.
4. *Gashti M.P.* Microscopic methods to study the structure of scaffolds in bone tissue engineering: a brief review. In book: *Current microscopy contributions to advances in science and technology.* Badajoz: Formatex Research Centre, 2012. 625 p.
5. *Bhatia S.K.* // *Biotech. J.* 2010. V. 5. № 12. P. 1309.
6. *Iandolo D., Pennacchio F. A., Mollo V. et al.* // *Adv. Biosystems.* 2018. V. 3. № 2. Art. № 1800103.
7. *Ahmadi Z., Moztarzadeh F.* // *Proc. Int. Conf. Comp. Biol. Bioinform. (Newark, 2017).* P. 93.
8. *Yang M.* Advanced bioimaging technologies in assessment of the quality of bone and scaffold materials techniques and applications. Berlin-Heidelberg-New York: Springer, 2007. P. 259.
9. *Mayo S.C., Stevenson A.W., Wilkins S.W.* // *Materials.* 2012. V. 5. № 12. P. 937.
10. *Albertini G., Giuliani A., Komlev V. et al.* // *Tissue Engin. C.* 2009. V. 15. № 3. P. 403.
11. *Агапова О.И., Ефимов А.Е., Мойсенович М.М. и др.* // *Вестн. трансплантологии и искусств. органов.* 2015. Т. 17. № 2. С. 37.
12. *Родина А.В., Тенчурин Т.Х., Сапрыкин В.П. и др.* // *Клеточные технол. в биол. и мед.* 2016. Т. 3. С. 152.
13. *Ding C.M., Zhou Y., He Y.N., Tan W.S.* // *Proc. Biochem.* 2008. V. 43. № 3. P. 287.
14. *Mikhutkin A.A., Kamyshinsky R.A., Tenchurin T.K. et al.* // *BioNanoScience.* 2018. V. 8. № 2. P. 511.
15. *Darcy H.* Les fontaines publiques de la ville de Dijon. Ed. Dalmont V. Paris, 1856. 653 p.
16. *Whitaker S.* The Method of Volume Averaging. Dordrecht–Boston–London: Kluwers Academic Publishers, 1999. 221 p.
17. *Zockler M.* Interactive visualization of 3D-vector fields using illuminated stream lines. San Francisco: IEEE Computer Society and ACM, 1996. P. 107.
18. *Rosanwo O.* Dual Streamline Seeding. Beijing: IEEE VGTC, 2009. P. 9.